

- (19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)
- (12) Official Gazette for Unexamined Patent Applications (A)
- (11) Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) No. 9-163983
- (43) Disclosure Date: 24 June 1997
- | (51) | Int.Cl. <sup>6</sup> | Ident. Symbols | Internal Office Nos. | FI         | Technology Indication |
|------|----------------------|----------------|----------------------|------------|-----------------------|
|      | C12N 15/09           |                | 9282-4B              | C12N 15/00 | A                     |
|      | 5/10                 |                |                      | C12P 21/00 | C                     |
|      | C12P 21/02           |                |                      | 21/08      |                       |
|      | 21/08                |                |                      | A61K 39/00 | A                     |
|      | // A61K 39/00        |                |                      |            | H                     |

Request for Examination: Not yet requested

Number of Claims: 4	OL	(Total of 10 pages)	(Continued on last page)
(21) Application No.:	8-231124	(71) Applicant:	000160522 Hisamitsu Pharmaceutical Company, Ltd. 408 Tashiro Daikan-machi, Tosu- shi, Saga-ken
(22) Application Date:	30 August 1996	(72) Inventor:	Eiji Suzuki 2-4-11 Yayoi, Bunkuo-ku, Tokyo-to
(31) Priority Claim No.:	7-221953	(72) Inventor:	Kazuhiro Yuda c/o Tsukuba Research Laboratories Hisamitsu Pharmaceutical Company, Ltd. 1-25-11 Kanondai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
(31) Priority Date:	30 August 1996	(72) Inventor:	Katsuhiko Akiyama c/o Tsukuba Research Laboratories Hisamitsu Pharmaceutical Company, Ltd. 1-25-11 Kanondai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
(33) Country of Priority Claim:	Japan (JP)	(74) Agent:	Kyozo Yuasa, Patent Attorney (And 5 Other)
Published in "Abstracts of Lectures of Research Papers at the 60th Annual Meeting of the Chemical Industry Society published by the Chemical Industry Society, Incorporated, on 1 March 1995 as requested in accordance with Paragraph 1, Article 30, of the Patent Act.		Continued on last page	

(54) Title of the Invention: An Efficient Production Method of Useful Substances by Apoptosis Control and Cells

(57) [Abstract]

[Problem] To provide a method for recovery of useful substances in large quantities from animal cells and cells.

[Means of Solution] A method for improving production capacity of useful target substances by introducing apoptosis inhibiting genes into animal cells that produce useful substances and cells that are obtained by said introduction.

## [Claims]

[Claim 1] A method for improving production capacity of useful target substances by introducing apoptosis inhibiting genes into animal cells that produce useful substances.

[Claim 2] A production method as described in Claim 1 characterized in that the apoptosis inhibiting genes are bcl-2, BAG-1, Bcl-XL, Ad, E1b or CrmA.

[Claim 3] A method as described in Claim 1 in which the animal cells are COS-1 cells into which bcl-2 is introduced and that are deposited as FERM P-15808.

[Claim 4] Cells that are COS-1 cells into which bcl-2 is introduced and that are deposited as FERM P-15808.

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of Technology to Which the Invention Pertains] This invention relates to a novel useful substance production method and cells. In greater detail, it relates to a method for improvement of production capacity of useful substances including, for example, various types of antibodies that are produced by hybridomas, virus vectors for gene therapy and various types of recombinant proteins, cytokines such as, for example, interferon and antigenic substances for vaccines and to a type of cell that is obtained by this method and that is used for this purpose.

[0002]

[Prior art] Various molecular biological methods have been developed as a result of the rapid progress of genetic engineering in recent years. By these means, marked advances have been seen in the analysis of genetic information and in clarification of gene function and diverse information has been obtained regarding several useful substances. There has been production of many useful substances as an attempt to apply the results obtained from these findings to actual production fields. For example, antibodies are proteins that are produced in living organisms by immune responses as a result of antigen stimulation. They have the activity of binding specifically with immunogens and play the role of a defensive mechanism in the body. Various analytical agents, diagnostic drugs or therapeutic drugs are being developed making use of the specific binding activity of antibodies to such immunogens. These antibodies, which are used industrially, are produced primarily by culturing hybridomas that produce the target antibodies.

[0003] Other useful substances, such as, for example, cytokines such as interferon, vaccines, enzymes, peptide hormones and virus vectors for gene therapy are produced by various types of animal cells.

[0004] Below, we shall indicate useful substances that are produced by animal cells.

[0005] (1) Monoclonal antibodies.

The general method for manufacture of monoclonal antibodies is, first, to immunize a mammal with immunogens and collect B cells. Next, these B cells and myeloma cells, specifically, cells originating from mice such as X63-Ag8 (X63), NSI-Ag4/1 (NS1), P3X63-Ag8, 654 (X63-654), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45, 6TG1. 7(45, 6TG), FO, S149/5XXO and BU. 1; originating from rats such as 210. RSY3. Ag1. 2. 3 (Y3); and originating from human beings such as U-226AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) and 8226AR/NIP4-1 (NIP41) (the characters in parentheses being omitted, however), are mixed with fusion promoting agents such as polyethylene glycol (PEG) and Sendai virus (HVJ), with cell fusion being effected to manufacture a hybridoma in which antibody producing capacity and cell proliferation capacity are combined. Identification of said antibody producing strains is effected from the hybridomas that have been prepared by the ELISA method (Method in Enzymology, Vol. 70, pp. 419-439), the agglutination reaction method, the RIA method and the double immunodiffusion method. Cloning is performed by the limiting dilution method. In order to obtain antibodies from these hybridomas, the hybridomas are cultured in a culture medium. There are methods in which they are separated from the culture supernatant or methods in which the hybridoma is administered intraperitoneally in a mouse and recovered from the abdominal fluid.

[0006] (2) Vaccines against viruses

In order to obtain a vaccine against a virus, the target gene is introduced into a suitable cell strain and the target recombinant protein is produced. As specific examples, there are production of vaccines against polio (dead virus, live virus) by means of cultured monkey kidney cells and human diploid cells, production of vaccines against human adenoviruses by means of Hela cells and human diploid cells, production of vaccines against measles by means of cultured chick embryo cells, production of vaccines against mumps by means of cultured chick embryo cells, production of vaccines against rubella by means of cultured chick embryo cells, cultured monkey kidney cells, human diploid cells, dog kidney cells or rabbit kidney cells, production of vaccines against rabies by means of human diploid cells,

production of vaccines against type B hepatitis by means of B hepatitis antibody positive human plasma, production of vaccines against foot-and-mouth disease by means of cultured monkey kidney cells, production of vaccines against Newcastle disease by means of hamster kidney cells and production of vaccines against distemper by means of hamster kidney cells.

[0007] (3) Factors that act on the immune system (cytokines)

As examples of production of cytokines using animal cells, there are production of IL-2 by helper T cells, production of M-CSF by mouse L cells, production of G-CSF by CHU-2 cells, production of GM-CSF by embryos and placenta induced by Mo cells and endotoxins, production of IL-1 by monocytes and macrophages, production of IL-3 by T lymphocytes, production of IL-4 by mouse T-cell hybridomas, production of IL-5 by T lymphocytes, production of IL-6 by T lymphocytes, production of erythropoietin by the kidney, production of TNF by human myelogenous leukemia cells and macrophages, production of lymphotoxin by human B cell strains, production of interferon- $\alpha$  by lymphoblast cells originating from B lymphocytes and Burkitt's lymphoma, production of interferon- $\beta$  by diploid fibroblasts and production of interferon- $\gamma$  by T lymphocytes.

[0008] (4) Cell growth factor

Examples of production of cell growth factor by animal cells include production of EGF by submaxillary gland and glial cells, production of TGF- $\alpha$  by sarcoma [TRANSLATOR'S NOTE: *There is an apparent misprint here for the first character of the term for "sarcoma." This is assumed from the subsequent use of the correct characters later in the paragraph.*] cells and placenta, production of PDGF by platelets and vascular endothelial cells, production of NGF by submaxillary gland, production of TGF- $\beta$  by kidney, placenta and many types of cultured cells, production of IGF-I smooth muscle cells and liver cells, production of IGF-II fetal liver cells and placenta and production of FGF cartilage sarcoma cells.

[0009] (5) Enzymes

Examples of production of enzymes by animal cells include production of tissue plasminogen activator (TPA) by normal human diploid fibroblasts, Chinese hamster ovary cells and cancer cells and production of renin by Chinese hamster ovary cells.

[0010] (6) Peptide hormones

In order to obtain peptide hormones from animal cells, the target gene is introduced into a suitable cell strain and the target recombinant peptide hormone is produced. Specifically, there is production of growth hormone by Vero and C127 cells.

[0011] (7) Virus vectors

At present, virus vectors are produced by recombinant virus producing cells called packaging cell strains. Packaging cell strains are cell strains in which the exogenous genes required to produce recombinant viruses are inserted into the host cell genome sequence.

[0012] In actuality, Moloney leukemia virus vector is a virus vector that has been established in packaging cell strains (A.D. Miller et al., *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12: 175, 1986).

[0013] However, production of useful substances by these animal cells that have been described above has the following drawbacks.

(1) It is expensive because large quantities of culture medium are used for culture.

(2) The rate of production of useful substance per volume is less than that of the production of useful substances by prokaryotes.

(3) When cells that produce useful substances, for example, hybridomas which produced antibodies, are not sufficiently cultured, apoptosis is rapidly brought about and the cells commit suicide (*Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44, pp. 1140-1154, 1994).

[0014] For this reason, development of methods for intensifying the capacity for production of useful substances, i.e., methods for producing useful substances of capacity above that for producing useful substances when ordinary culturing is performed, is a major problem.

[0015] At present, methods for recovering useful substances from animal cells in large volumes are methods in which the volume of culture used in a single culture is large, in short, methods in which large quantities of culture equipment is used. Animal cells are generally classified into adhesion dependent cells such as CHO, CV-1, COS, BHK, mouse L cells, C127, Rat2, NIH3T3 and HeLa cells and free cells such as Namalwa cells. Various methods have been

proposed as large volume culture methods for them. Specifically, the methods that are used for expanding the adhesion area of adhesion-dependent cells include the multiplate, the enamel fiber, the ultrafiltration membrane, the porous ceramics and the microcarrier methods. The methods that are used for free cells include the microcarrier, the spinner flask, the stirring culture tank, the irrigation culture tank and the air lift culture tank methods. However, the level of high density culture that is the goal cannot be achieved by any of these methods (in a jar fermentator [phonetic; should be fermentor. Translator]  $10^4$ - $10^7$  cells/ml, a number of cells corresponding to 1 kL - 10 kL).

[0016] In ordinary animal cell culturing, it is necessary to add on the order of 10% of serum to the basic culture medium. However, the addition of serum entails the problems that it has great effects on production costs, that there are great differences in cell proliferation activity among various serum lots, with the result that stable production of useful substances is not possible, that the serum contains large amounts of unknown substances and that purification of the products is difficult. For these reasons, serum-free culture media to which it is not necessary to add serum are used in industrial scale production. However, the problem remains that production efficiency of useful substances is lower than that when culturing is performed in culture media that contain serum.

[0017] Various methods have been proposed for the purpose of increasing production efficiency of these useful substances. Specifically, methods that can be cited include a method in which, when antibody-producing hybridomas are transplanted in mouse peritoneum, mitogens and Freund's complete adjuvant are administered intraperitoneally, with the volume of abdominal fluid being increased and with the absolute quantity of antibody that is obtained being increased (Japanese Patent Application Early Disclosure No. 02-53736 [1990]), a method in which animal cells are cultured at high density over long periods and the products are stabilized by culturing isolated animal cells using a serum-free culture solution on a porous substrate in the form of a three-dimensional aggregate (Japanese Patent Application Early Disclosure No. 03-160988 [1991]) and a method in which lymphocyte growth factors such as ovary lipoproteins, royal jelly and lactoferrin are added to the culture medium (Japanese Patent Application Early Disclosure No. 02-257892 [1990]).

[0018] However, oligotrophication accompanies cell growth and apoptosis of cells in association with that, cannot be avoided in any of these methods and there are limitations on the production volume of useful substances.

[0019]

[Problems the invention is intended to solve] The objective of this invention, when antibodies, cytokines such as interferon, antigenic substances such as vaccines, and useful substances such as virus vectors for gene therapy are produced from animal cells, is to make possible survival of animal cells over long periods and to bring about an increase in production efficiency per unit quantity of culture as a result thereof.

[0020]

Intensive studies were conducted for the purpose of achieving these objectives. As a result, the inventors perfected this invention by discovering that death of animal cells that produce antibodies, cytokines such as interferon, antigenic substances such as vaccines, and useful substances such as virus vectors for gene therapy can be inhibited and that capacity for production of useful substances by animal cells per unit culture volume can as a result be markedly increased by inhibiting apoptosis of animal cells that produce useful substances.

[0021] Specifically, this invention provides a method for increasing production capacity of target useful substances by introducing apoptosis inhibiting genes into animal cells that produce useful substances and to provide COS-1 cells into which BCMGSneo-bcl-2, which are cells that are used for the objectives of said method, is introduced. When the method and cells of this invention are used, the survival rates of useful substance producing cells can be increased and increases can be obtained in useful substance production volume per unit culture volume and in useful substance production speeds.

[0022]

[Mode of execution of the invention] When the method of this invention is used, it is applicable to any type of useful substance production capacity such as antibodies, cytokines such as interferon, antigenic substances such as vaccines, and useful substances such as virus vectors for gene therapy as long as they can be produced by animal cells.

[0023] The term apoptosis inhibiting genes in this specification refers, for example, to genes that inhibit apoptosis that is induced by such diverse factors as elimination of cell growth factor, elimination of hormones, receptor stimulation by cytotoxic lymphocytes, anticarcinogenic agents, radiation, toxins, viral infections, zinc ion deficiency, heat shock, tumor necrosis factors such as TNF- $\alpha$  and  $\beta$  and anti-Fas antibodies and that encode proteins that have the function of extending cell life. The apoptosis inhibiting genes that can be used in this invention include, for example, bcl-2, BAG-1, Bcl-XL, Ad. Elb and CrmA. bcl-2, which is one of these examples, is markedly expressed in a broad range of tissues in the body, and, in particular, in the immune system and the nervous system. Expression is also observed in epithelial cells such as the skin and small intestine in which stem cells are present over long periods (Negrini, M. et al., Cell, 49: 455-463, 1097; Eguchi, Y., et al.: Nuc. Acid Res., 20: 4187-4192, 1992; Hockenberry,

D.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 6961-6965, 1991) and it is thought that this plays a part in prevention of suicide and prolonging the life of cells in many aspects of the body (Vaux, D.L., et al., Nature, 335: 440-442, 1988). It is known that the bcl-2 gene is a gene that is cloned by chromosome translocation 7 (14; 18) of human non-Hodgkin's lymphoma (Science, Vol. 226, pp. 1097 (1984) and that encodes the 26 kD protein bcl-2 $\alpha$  and the 22 kD protein bcl-2 $\beta$ .

[0024] The method of intensifying production of useful substances of this invention is performed by introducing apoptosis inhibiting genes into cells that produce useful substances by the following method. There are no limitations to this method. Specifically, bcl-2 that is incorporated into an expression vector plasmid that contains, for example, a drug-resistant gene sequence, is introduced into useful substance producing cells. The methods that can be used for introducing the gene into the cell include, in addition to known physical introduction methods such as the electroporation method, the calcium phosphate method and the liposome method, the biological introduction method using virus vectors such as murine leukemia virus vector. After introduction, drug selection is performed by means of a drug corresponding to said drug resistance gene and only cells into which bcl-2 has been inserted are selected. There are no particular limitations on cloning methods and known methods such as, for example, the methyl cellulose, the soft agarose method and the limiting dilution method. The cell strains that are obtained by drug selection have useful drug producing capacity in long-term culturing superior to that of cell strains into which apoptosis inhibiting genes are not inserted.

[0025] Speaking of culturing of antibodies, it is known that the culture time of hybridomas is prolonged and that their survival rates are decreased when the nutrient components in the culture medium are deficient. However, the lives of the cells can be prolonged and antibody production volume and production speed can be markedly increased by introducing an apoptosis inhibiting gene, for example, bcl-2.

[0026] This invention can also be used in the production of recombinant virus vectors that are used in gene therapy. In general, recombinant virus vectors are produced by recombinant virus vector producing cells that are called packaging cells. When packaging cells are cultured for a long period, it is known that the cells die due to oligotrophication. However, when an apoptosis inhibiting gene is introduced into a packaging cell, the life of the packaging cell is prolonged and its potency can be increased. Cell death due to oligotrophication of this kind also occurs in other recombinant protein producing cells as described above. However, by introducing an apoptosis inhibiting gene, the life of the cell can be prolonged just as in the case of packaging cells that produce recombinant virus vectors and production volume can be increased.

[0027] COS-1 cells of this invention into which BCMGSneo-bcl-2 has been introduced (hereafter referred to as COS1/bcl2) were discovered as a result of this invention as animal cells that can markedly increase the production volume and production speed of proteins by prolonging cell life and can be applied to large volume production of useful substances of categories (1) to (7) described above.  $\gamma$  chain proteins of good detection sensitivity were used as substitute substances for these proteins and the effectiveness of COS1/bcl2 was confirmed.

[0028] COS1/bcl2 was deposited on 26 August 1996 as FERM P-15808 at the Biotechnology and Industrial Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology.

[0029]

[Examples] We shall now present examples that illustrate this invention in specific terms. However, this invention is not limited by these examples.

[0030] Example 1: Construction of plasmids

In this example, the following plasmids were used.

[0031] The plasmid BCMGSneo-bcl-2 (Figure 1) containing the human bcl-2 gene sequence was constructed by inserting said bcl-2 gene into the Xho I-Not I site of the expression vector BCMGSneo (Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exp. Med., 172: 969-972, 1990). bcl-2 $\alpha$  was used as the bcl-2 gene.

[0032] As a comparative example, BCMGSneo (Figure 2) was used in the following experiment as a plasmid not containing the bcl-2 gene.

[0033] Example 2: Introduction of human bcl-1 gene into hybridoma cells

The BCMGSneo-bcl-2 that had been prepared in Example 1 and BCMGSneo, as Comparative Example 1, were inserted by the electroporation method into mouse hybridoma strain 2E3 that produce antibodies that recognize trinitrophenyl groups as haptens (Bio Manual Series 4, Gene Introduction and Expression Analysis Methods, pp. 23-27). After insertion, G418 (GIBCO) selection pressure was applied and only cells into which the plasmids had been introduced were selected.

[0034] Example 3: Detection of production of Bcl-2 protein of hybridoma cells into which human bcl-2 gene has been introduced (Analysis by Western blotting)

Detection of production of Bcl-2 protein of hybridoma cells into which the BCMGSneo-bcl-2 established in Example 2 had been introduced was performed. A similar study of hybridoma cells into which NCMGSneo had been introduced was performed as a negative control.

(1) Preparation of cell solutions

Suspensions of hybridoma cells into which BCMGSneo-bcl-2 had been introduced and of hybridoma cells into which BCMGSneo had been introduced were reacted at 4°C for 30 minutes using a cell solution containing 1% Triton X-100, 15 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.4), 50 µg/mL of phenyl methanesulfonyl fluoride and 2 µg/mL of aprotinin, with the cells being dissolved. This cell solution was used as the test solution for Western blotting.

[0035] (2) Analysis by Western blotting

Analysis by Western blotting was performed in accordance with known methods (Bio Manual Series 4, Gene Introduction and Expression Analysis Methods, pp. 123-127). Cell solution corresponding to  $1 \times 10^5$  cells was mixed with Tris-SDS-mercaptoethanol buffer solution and the mixture was boiled for 5 minutes, after which the test material was loaded in sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (13% being the most desirable concentration of the polyacrylamide gel when detecting bcl-2). After electrophoresis was concluded, the gel was removed and was immersed in Tris-glycine buffer solution for more than 30 minutes. A nitrocellulose filter was installed in the gel and the protein was transferred to the nitrocellulose filter, after which the nitrocellulose filter was removed and immersed for 15 minutes in Tris buffered saline-0.05% Tween 20 (TBS-T). It was then immersed for 2 hours in TBS-T containing 5% skim milk, after which it was washed three times with TBS-T.

[0036] The nitrocellulose filter prepared in this way was used. The nitrocellulose filter was immersed in TBS-T solution containing Bcl-2 antibodies (Boehringer Mannheim), the materials were gently agitated for 1 hour and were then washed 3 times with TBS-T solution, after which the nitrocellulose filter was immersed in TBS-T solution containing peroxidase bound anti-mouse Ig polyclonal antibodies (Bio Source International, Inc-Tago Products) as the second antibody. The materials were agitated gently for 1 hour and were then washed 3 times with TBS-T solution, after which the nitrocellulose filter was immersed in ECL detection reagent (Amersham) and exposed to film.

[0037] The results are shown in Figure 3. A band indicating expression of Bcl-2 protein was detected in cells into which BCMGSneo-bcl-2 had been introduced (shown in Figure 3 as Example 3). However, a band indicating expression of Bcl-2 protein was not detected from the cells of the negative control group into which BCMGSneo cells had been introduced (shown in Figure 3 as Comparative Example 3).

[0038] Example 4: Increase of survival rates of hybridoma cells by introduction of human bcl-2 gene

A comparison was made of survival rates of hybridoma cells into which the BCMGSneo-bcl-2 established in Example 2 had been introduced and of hybridoma cells into which BCMGSneo had been introduced which was the negative control group.

[0039] The respective cells were suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (hereafter, DMEM medium) (GIBCO Company) containing 9% bovine fetal serum and the suspension was allowed to stand in a CO<sub>2</sub> incubator. Cells were recovered every 2 minutes after culturing was begun and the survival rates of the respective hybridomas were calculated by the Trypan Blue staining method.

[0040] In the negative control group (shown in Figure 4 as Comparative Example 4), a survival rate of approximately 50% was shown on the sixth day of culturing. By contrast, in the group into which bcl-2 cells had been introduced (shown in Figure 4 as Example 4), this same level of survival was found on the tenth day. It can be concluded that this prolongation of the cell survival rate is attributable to the effect of the bcl-2 genes that were introduced into the cells.

[0041] Example 5: Increase of antibody production efficiency by introduction of human bcl-2 gene

A comparison was made of the antibody production capacity of hybridoma cells into which the BCMGSneo-bcl-2 established in Example 2 had been introduced and of hybridoma cells into which BCMGSneo had been introduced which was the negative control group.

[0042] The cells were suspended in DME culture medium containing 9% of bovine fetal serum and were placed in a CO<sub>2</sub> incubator. Culture supernatant was recovered every 2 days from the beginning of culturing and the concentration of antibodies in the supernatant was determined by the ELISA method. The ELISA method is a sandwich

method in which anti-mouse IgG polyclonal antibodies (ZYMED Laboratories) and peroxidase bound anti-mouse Ig polyclonal antibodies (Bio Source International, Inc-Tago Products) are used.

[0043] The results are shown in Figure 5. In the cell group into which bcl-2 had been introduced (shown in Figure 5 as Example 5), culture time was increased and antibody concentrations were markedly increased by comparison to the negative control group (shown in Figure 5 as Comparative Example 5), with a difference of more than 4 times being seen on the tenth day.

[0044] Example 6: Increase of antibody production speed by introduction of human bcl-2 gene

In addition, a comparative study was also conducted of the antibody production speeds of the hybridomas for which antibody production efficiency was determined in Example 5. As shown in Figure 6, antibody production speed in the group into which bcl-2 had been introduced (shown in Figure 6 as Example 6) was more than twice that in the negative control group (shown in Figure 6 as Comparative Example 6) at all times.

[0045] Example 7: Construction of plasmids

In this example, the plasmid indicated below was used. All of the procedures were performed by known methods (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

[0046] The plasmid BCMGSneo-bcl-2 containing human bcl-2 gene (Figure 1) was constructed by inserting said bcl-2 gene into the XhoI-NotI site of the expression vector BCMGSneo (Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exd., Med., 172: 969-972 (1990).

[0047] As a comparative example, the plasmid BCMGSneo that did not contain bcl-2 gene (Figure 2) was used in the following experiment.

[0048] The plasmid pcDNA- $\lambda$  (Figure 7) that contained the gene sequence that encodes the protein  $\lambda$  chain that the L chain of mouse immune globulin IgM (hereafter, mouse  $\lambda$ 1) was constructed by amplifying the mouse  $\lambda$ 1 chain component from pCMV- $\lambda$ 1 (Toyoshima, H. et al., Cell, 8, 67-74, 1994) by the PCR method, synthesizing cDNA and inserting it into the plasmid vector pcDNA3 (Invitrogen Company).

[0049] Example 8: Introduction of human bcl-2 gene into COS-1 cells

BCMGSneo-bcl-2 or BCMGSneo was introduced into COS-1 cells by the electroporation method (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

[0050]  $10^7$  COS-1 cells were prepared and were suspended in 450  $\mu$ l of phosphate buffer solution (PBS). 10  $\mu$ g of plasmid DNA was dissolved in 50  $\mu$ l of PBS and the solution was mixed with the aforementioned cell suspension and introduced into a cuvette. The pulse device was set at 650 V and 250  $\mu$ sec and a pulse was applied 20 times to the cuvette into which the cell suspension had been introduced. The cuvette was allowed to stand on ice for 10 minutes, after which it was mixed with Dulbecco's Modified Eagle Medium (hereafter, DMEM) (GIBCO Company) containing 400  $\mu$ g/ml of G418 (GIBCO Company) and 10% bovine fetal serum (FBS) (GIBCO Company). The mixture was allowed to stand for 30 days in a CO<sub>2</sub> incubator, by which means only those cells into which gene had been introduced were selected and COS-1 cells into which BCMGSneo-bcl-2 had been introduced (hereafter, COS1/bcl2) and COS-1 cells into which BCMGSneo had been introduced (hereafter, COS1/vec) were obtained. The COS-1 cells into which BCMGSneo had been introduced (hereafter, COS1/bcl2) were deposited as FERM P-15808 at the Biotechnology and Industrial Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology.

[0051] Experimental Example 7: Evaluation of resistance to apoptosis of cells into which bcl-2 has been introduced

When cells are cultured in a culture medium of a low serum concentration, it is known that this serves as a trigger for induction of apoptosis, with cell death occurring. For this reason, the following study was conducted for the purpose of investigating resistance to apoptosis of cells into which bcl-1 has been introduced.

[0052] (Determination of live cell counts on culturing in culture media of low serum concentration of COS-1 cells into which human bcl-2 gene had been introduced) COS1/bcl2 (Example 8) and COS1/vec (Comparative Example 7) were cultured in amounts of  $10^5$  cells for fixed periods in DMEM culturing medium containing 0.2% FBS. The culture dishes were washed with PBS on the 2nd day and 9th day after culturing was begun, the cells were stripped from the culture dishes by treatment with trypsin and cell suspensions were prepared. The cells were stained with Trypan Blue, after which they were observed under the microscope and the number of live cells was counted. The results are shown in Figure 8. The cells indicated in Comparative Example 7 into which bcl-2 gene had not been introduced exhibited increase and decrease by comparison to the cell count when culturing was begun ( $10^5$  cells). By contrast, the

cells indicated in Example 8 into which bcl-2 gene had been introduced had proliferated to more than 4 times the initial cell count by the 9th day. From these results, it is clear that the COS1/bcl2 cells established in Example 8 exhibited strong apoptosis resistance.

**[0053] Experimental Example 8. Increase of protein productivity by introduction of bcl-2 gene**

COS-1 cells originating from the African green monkey are widely used for expression and production of recombinant proteins. Accordingly evaluations of protein productivity were made when apoptosis inhibiting gene was introduced.

[0054] (Transfection of pcDNA- $\lambda$  to COS1/bcl2, COS1/vec and COS-1 cells) The respective cells were sown in amounts of  $5 \times 10^5$  in culture dishes of 10 cm in diameter on the day before transfection. 10  $\mu$ g of pcDNA- $\mu$  was transfected by the DEAE-dextran method (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and the materials were allowed to stand for 4 hours in a carbon dioxide culture chamber. The supernatant was suctioned off, 5 ml of 10% DMSO aqueous solution was added and the materials were allowed to stand for 2 minutes, immediately after which they were washed 2 times with PBS (-). 10 ml of DMEM culture medium containing 10% bovine serum was added and culturing was performed for a fixed period.

[0055] (Recovery of culture supernatant solution and quantitative determination of  $\lambda$  chain protein in the culture supernatant) Amounts of 350  $\mu$ l at a time of culture supernatant solution of the respective cells into which pcDNA- $\lambda$  had been introduced were recovered after 4, 5, 6, 7 and 14 days, taking the day transfection was performed as the starting point. Quantitative determinations were made of  $\lambda$  chain protein contained in the culture supernatant solution by the ELISA method using goat anti-mouse  $\lambda$  chain antibodies labeled with horse radish peroxidase and the findings were expressed as ratios taking the quantity on the 4th day as 1. The cumulative quantity of  $\lambda$  chain protein was determined by the absorbance at 410 nm. As shown in Figure 9, in the cell strains into which bcl-2 gene, which is the apoptosis inhibiting gene, was not introduced (Comparative Example 7 and Comparative Example 8), the cumulative quantity of  $\lambda$  chain protein did not increase after the 7th day, whereas, by contrast, in the cell strain into which bcl-1 had been introduced (Example 8), the quantity had more than doubled by the 7th day.

[0056]

[Effect of the invention] As described above, the survival rates of useful substance producing cells were markedly increased and the production quantity and production speed of useful substances were markedly increased by means of the method of intensifying useful substance production capacity and of the cells of this invention.

[0057] Consequently, using the method and cells provided by this invention, it is possible to apply them, for example, to the production of hybridomas that produce various antibodies, cytokines such as interferon, antigenic substances for vaccines, virus vectors for gene therapy and other useful substances.

[0058] The method of intensifying antibody production and the cells of this invention can be executed and induced using not only bcl-2 indicated on the examples but also other apoptosis inhibiting genes (Mad/Max, BAG-1, Bcl-XL, Ad. E1b, CrmA, etc.) and have an extremely great range of industrial application.

[Brief Explanation of the Figures]

[Figure 1] This is a figure that shows the structure of BCMGSneo-bcl-2.

[Figure 2] This is a figure that shows the structure of BCMGSneo.

[Figure 3] This is a figure that shows the results of Western blotting.

[Figure 4] This is a graph that shows the relationship between culture time and the survival rates of hybridoma cells.

[Figure 5] This is a graph that shows the relationship between culture time and antibody concentration in the culture supernatant.

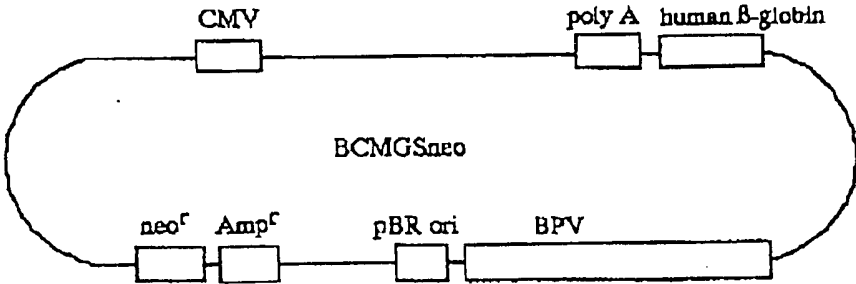
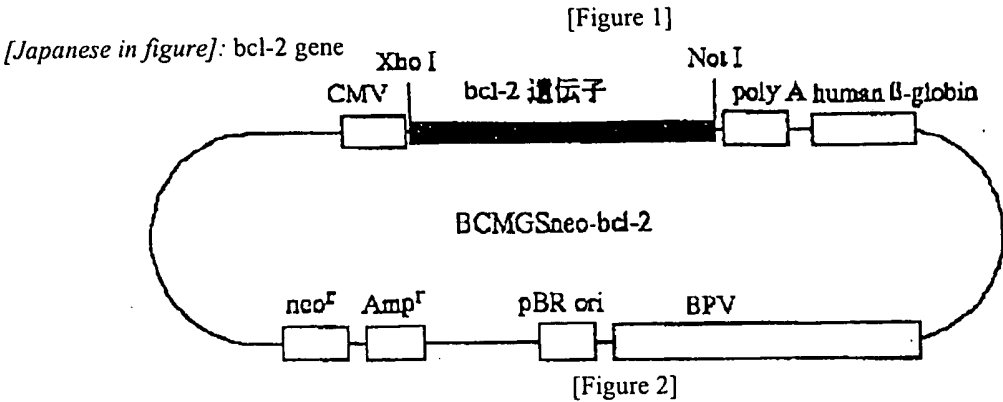
[Figure 6] This is a graph that shows determinations of the antibody production speed at each fixed time during the culture period.

[Figure 7] This is a figure that shows the structure of pcDNA- $\lambda$ .

[Figure 8] This is a graph that shows the relationship between culture time and the survival rates of COS-1 cells into which the gene has been inserted.

[Figure 9] This is a graph that shows determinations of cumulative quantities of proteins at each fixed time during the culture period.



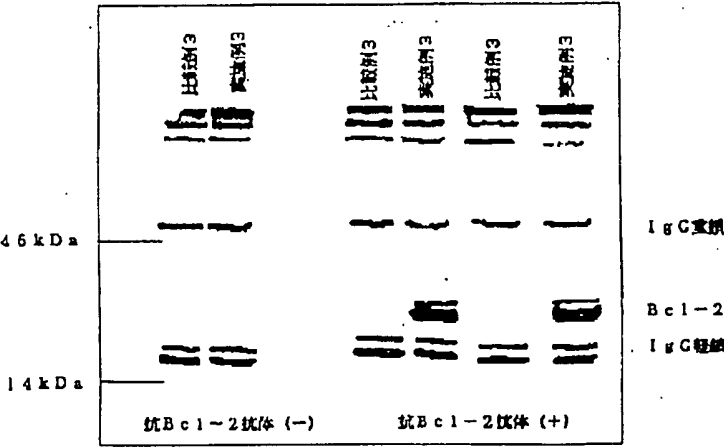


[Figure 3]  
[Key for top, left to right]  
Comparative Example 3  
Example 3

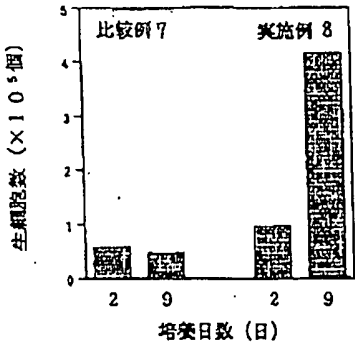
Comparative Example 3  
Example 3

Comparative Example 3  
Example 3

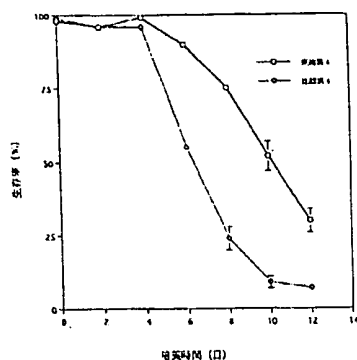
[bottom, left to right]: Anti-Bcl-2 antibodies (-); Anti-Bcl-2 antibodies (+)



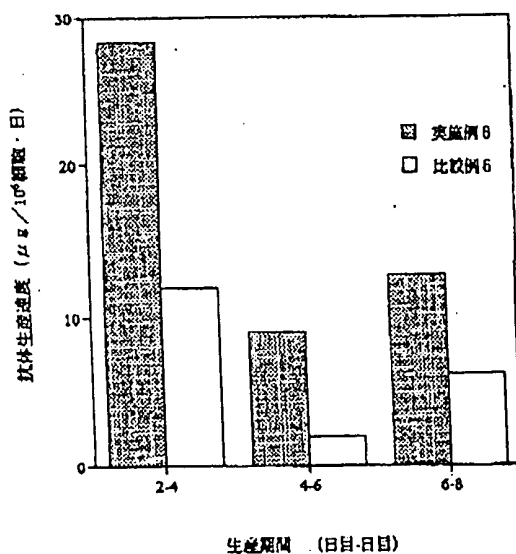
[Figure 8]  
[vertical axis]: Number of live cells ( $\times 10^5$  cells)  
[horizontal axis]: Number of days of culture (days)  
[inside table, left to right]:  
Comparative Example 7; Example 8



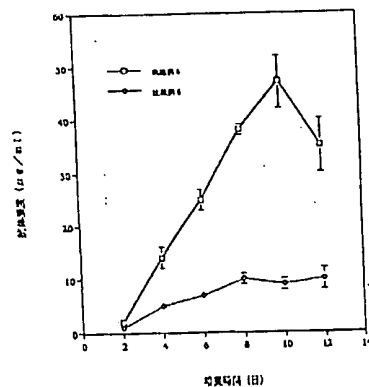
[Figure 4]  
[vertical axis]: Survival rate (%)  
[horizontal axis]: Number of days of culture (days)  
[inside figure, top to bottom]:  
Example 4  
Comparative Example 4



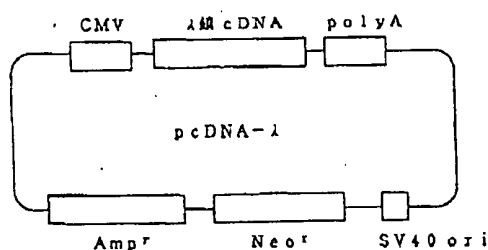
[Figure 6]  
[vertical axis]: Antibody production speed ( $\mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \cdot \text{day}$ )  
[horizontal axis]: Production period (day - day) [NOTE: actually: -th day - -th day]  
[inside figure, top to bottom]:  
Example 6  
Comparative Example 6



[Figure 5]  
[vertical axis]: Antibody concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
[horizontal axis]: Number of days of culture (days)  
[inside figure, top to bottom]:  
Example 5  
Comparative Example 5



[Figure 7]  
[Japanese]:  $\lambda$  chain cDNA



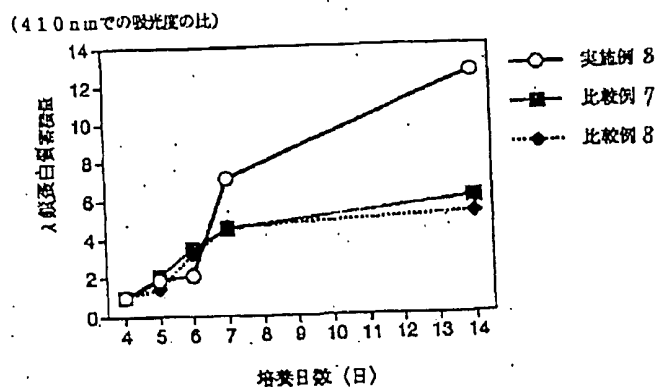
[Figure 9]

[above graph on left]: Ratio of absorbance at 410 nm)  
 [vertical axis]: Cumulative quantity of  $\lambda$  chain protein  
 [horizontal axis]: Number of days of culture (days)  
 [matter to right of graph, top to bottom]:

Example 8

Comparative Example 7

Comparative Example 8



Continued from front page

(51)	Int.Cl. <sup>6</sup>	Ident. Symbols	Internal Office Nos.	FI	Technology Indication	
	A61K	39/00		A61K	39/395	A
		39/395				D
				C12N	5/00	B
	(C21N	5/10				
	C12R	1:91)				
	(C12P	21/02				
	C12R	1:91)				
(72)	Inventor:	Takeshi Goto c/o Tsukuba Research Laboratories Hisamitsu Pharmaceutical Company, Ltd. 1-25-11 Kanondai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken				
(72)	Inventor:	Hidetsugu Sato c/o Tsukuba Research Laboratories Hisamitsu Pharmaceutical Company, Ltd. 1-25-11 Kanondai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken				

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-163983

(43) 公開日 平成9年(1997)6月24日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
5/10			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			21/08	
21/08			A 6 1 K 39/00	A
// A 6 1 K 39/00				H

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-231124	(71) 出願人	000160522 久光製薬株式会社 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地
(22) 出願日	平成8年(1996)8月30日	(72) 発明者	鈴木 栄二 東京都文京区弥生2-4-11
(31) 優先権主張番号	特願平7-221953	(72) 発明者	湯田 和洋 茨城県つくば市観音台1-25-11 久光製 薬株式会社筑波研究所内
(32) 優先日	平7(1995)8月30日	(72) 発明者	秋山 勝彦 茨城県つくば市観音台1-25-11 久光製 薬株式会社筑波研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外5名)
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年3月1日 社団法人化学工学会発行の「化学工学会第60年会研究発 表講演要旨集」に発表		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アポトーシス抑制による有用物質の効率的生産方法および細胞

(57) 【要約】

【課題】 有用物質を動物細胞から大量に回収するための  
の方法および細胞を提供する。

【解決手段】 有用物質を生産する動物細胞にアポトー  
シス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物  
質の生産能を向上する方法および該導入により得られた  
細胞。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有用物質を生産する動物細胞にアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物質の生産能を向上する方法。

【請求項2】 アポトーシス抑制遺伝子が、bcl-2、BAG-1、Bcl-XL、Ad. E1bまたはCrmAであることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

【請求項3】 動物細胞が、bcl-2導入COS-1細胞であってFERM P-15808として寄託された細胞である請求項1記載の方法。

【請求項4】 bcl-2導入COS-1細胞であってFERM P-15808として寄託された細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な有用物質生産法および細胞に関する。さらに詳しくは、例えば、ハイブリドーマによって生産される種々の抗体、遺伝子治療用ウィルスベクター、種々の組換え蛋白質例えば、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質等の有用物質の生産能向上法、ならびに該方法によって得られ、かつその目的のために使用される細胞の1種に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の遺伝子工学の急速な進歩により、様々な分子生物学的手法の開発が行われた。それによって、遺伝子情報の解析あるいは遺伝子の機能の解明においても著しい進歩が見られ、数々の有用物質についてさまざまな知見が得られるようになってきた。これらの知見から得られた成果を実際の産業分野に応用しようとする試みの一つとして、動物細胞による有用物質の生産が数多くなされるようになってきた。例えば、抗体は、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内において生産される蛋白質であり、免疫原と特異的に結合する活性を持ち、生体における防御機構の役割を担っている。このような免疫原に対する抗体の特異的結合活性を利用して、種々の分析薬、診断薬、あるいは治療薬が開発されている。これらの産業上用いられている抗体は、主に、目的抗体を生産するハイブリドーマを培養して生産されている。

【0003】また、他の有用物質例えば、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン、酵素、ペプチド性ホルモン、遺伝子治療用ウィルスベクター等も、種々の動物細胞により生産されている。

【0004】以下に、動物細胞によって生産されている有用物質例を示す。

【0005】(1)モノクローナル抗体  
一般に、モノクローナル抗体の製造法としては、まず、免疫原を哺乳動物に免疫し、B細胞を採取する。次に、これらのB細胞と骨髓腫細胞、具体的には、マウス由来

では、X63-Ag8 (X63)、NS1-Ag4/1 (NS1)、P3X63-Ag8.654 (X63.654)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1、等；ラット由来では、210.RSY3.Ag1.2.3 (Y3)、等；ヒト由来では、U-226AR (SKO-007)、GM1500.GTG-A12 (GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2 (HMy2)、8226AR/NIP4-1 (NIP41)等（ただし、括弧内は略号を示す）の細胞とを、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルス (HVJ) といった融合促進剤と共に混合して細胞融合させ、抗体産生能と増殖能を合わせ持つハイブリドーマを作製する。また、作製したハイブリドーマからの該抗体産生株の検索は、ELISA法 (Method in Enzymology vol. 70, pp 419-439)、凝集反応法、RIA法、二重免疫拡散法などにより行われる。クロニングは、限界希釈法により行われる。これらのハイブリドーマから抗体を得るには、ハイブリドーマを培地中にて培養し、培養上清から分離する方法、あるいは、ハイブリドーマを、マウス腹腔内に投与し、その腹水より回収する方法がある。

【0006】(2)ウィルスに対するワクチン  
ウィルスに対するワクチンを得るには、目的遺伝子を、適当な細胞株に導入し、目的組換え蛋白質を生産させている。具体例としては、培養サル腎細胞、ヒト二倍体細胞によるポリオ（死ウィルス、生ウィルス）に対するワクチン生産、HeLa細胞、ヒト二倍体細胞によるアデノウィルスに対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞による麻疹に対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞によるおたふく風邪に対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞、培養サル腎細胞、ヒト二倍体細胞、イヌ腎細胞、あるいはウサギ腎細胞による風疹に対するワクチン生産、ヒト二倍体細胞による狂犬病に対するワクチン生産、B型肝炎抗体陽性ヒト血漿によるB型肝炎に対するワクチン生産、培養サル腎細胞による口蹄疫に対するワクチン生産、培養サル腎細胞、ハムスター腎細胞によるニューキャッスル病に対するワクチン生産、培養サル腎細胞、ハムスター腎細胞によるジステンパーに対するワクチン生産等がある。

【0007】(3)免疫系に作用する因子（サイトカイン類）

動物細胞を用いてサイトカイン類を生産する例としては、ヘルパーT細胞によるIL-2の生産、マウスL細胞によるM-CSFの生産、CHU-2細胞によるG-CSFの生産、Mo細胞、エンドトキシンで誘導された胚や胎盤によるGM-CSFの生産、単核球、マクロファージによるIL-1の生産、Tリンパ球によるIL-3の生産、マウスT細胞ハイブリドーマによるIL-4

の生産、Tリンパ球によるIL-5の生産、Tリンパ球によるIL-6の生産、腎によるエリスロポエチンの生産、ヒト骨髄性白血病細胞、マクロファージによるTNFの生産、ヒトB細胞株によるリンフォトキシンの生産、Bリンパ球、パーキットリンパ腫由来リンパ芽球細胞によるインターフェロン- $\alpha$ の生産、二倍体繊維芽細胞によるインターフェロン- $\beta$ の生産、T-リンパ球によるインターフェロン- $\gamma$ の生産等がある。

#### 【0008】(4) 細胞成長因子

動物細胞による細胞成長因子の生産例としては、顎下腺、グリア細胞によるEGFの生産、内腫細胞、胎盤によるTGF- $\alpha$ の生産、血小板、血管内皮細胞によるPDGFの生産、顎下腺によるNGFの生産、血小板、腎、胎盤、多くの培養細胞によるTGF- $\beta$ の生産、平滑筋細胞、肝細胞によるIGF-Iの生産、胎児肝細胞、胎盤によるIGF-IIの生産、大脳、軟骨肉腫細胞によるFGFの生産等が挙げられる。

#### 【0009】(5) 酵素

動物細胞による酵素の生産例としては、正常ヒト二倍体繊維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞や癌細胞による、ティッシュプラスミノゲンアクティベータ(TPA)の生産、チャイニーズハムスター卵巣細胞によるレニンの生産等が挙げられる。

#### 【0010】(6) ペプチド性ホルモン

ペプチド性ホルモンを動物細胞から得るには、目的遺伝子を、適当な細胞株に導入し、目的とする組換えペプチド性ホルモンを生産させる。具体的には、Ver o、C127細胞による成長ホルモンの生産などがある。

#### 【0011】(7) ウィルスベクター

現在、ウィルスベクターは、パッケージング細胞株と呼ばれる組換えウィルス産生細胞によって生産されている。パッケージング細胞株は、組換えウィルスを生産するために必要な外来遺伝子が宿主細胞ゲノム配列に挿入された細胞株のことである。

【0012】実際に、パッケージング細胞株が樹立されているウィルスベクターに、モロニー白血病ウィルスベクター(A.D. Miller et al., Sout. Cell Mol. Gene t., 12:175, 1986)等がある。

【0013】しかしながら、以上に述べてきたこれら動物細胞による有用物質の生産は、

(1) 培養に、大量の培地を使うので、費用が多くかかる；

(2) 動物細胞は、原核生物による有用物質生産と比べると体積当たりの有用物質生産速度が低い；および

(3) 例えば、抗体を生産するハイブリドーマ等の有用物質産生細胞は、栄養が不足すると、急速にアポトーシスを起こして自殺してしまう(Biotechnology and Bioengineering, vol. 44, pp. 1140-1154, 1994)という欠点を有している。

【0014】それゆえ、有用物質産生能強化法すなわち、通常の培養を行っているときの有用物質産生能力以上に有用物質を生産させる方法の開発が、大きな課題となっている。

【0015】現在、有用物質を動物細胞から大量に回収するための方法として、一度の培養に用いる培養量を多くする方法、つまり、大量培養装置を用いる方法がある。動物細胞は、CHO、CV-1、COS、BHK、マウスL細胞、C127、Rat 2、NIH3T3、あるいはHeLa細胞などの接着依存性細胞と、ナマルバ細胞などの浮遊細胞とに大別できるが、それぞれについて、大量培養法として様々な方法が考案されている。すなわち、接着依存性細胞では、接着面積を拡大させるために、マルチプレート、ホーローファイバー、限外濾過膜、多孔質セラミックス、マイクロキャリアなどを用いる方法、浮遊細胞では、マイクロキャリア、スピナーフラスコ、攪拌培養槽、灌流培養槽、エアリフト培養槽などを用いた方法がある。しかし、いずれの培養法においても、目指すべき高密度培養の水準には達していない(ジャーファーマンテーターで、1kL-10kL相当細胞数にして、 $10^4$ - $10^7$ 細胞/ml)。

【0016】また、通常動物細胞の培養には、基礎培地に加えて、10%程度の血清を添加する必要がある。しかし、血清の添加は、生産コストに大きく影響すること、また、各血清のロットの間で細胞の増殖活性が異なり、これによって、安定した有用物質の生産ができないこと、血清中には、多くの未知物質が含まれており、生産物の精製を困難としているなどの問題点がある。このような理由から、工業的規模の生産では、血清の添加を必要としない無血清培地が用いられているが、血清を含む培地で培養した場合と比べると有用物質の生産効率が低いという問題点が依然として残っている。

【0017】これら有用物質の生産効率を向上させるためにいくつかの方法が考案されている。具体的には、抗体生産ハイブリドーマをマウス腹腔内に移植する際に、マイトジェン及び、フロイント完全アジュバント等を腹腔内に投与し、腹水量を多くして得られる抗体の絶対量を増大させる方法(特開平02-53736号公報)、単離した動物細胞を、3次元集合体として多孔性基材上で血清不含培養液を用いて培養することにより、動物細胞を高密度で長期にわたりその生産物を安定して生産させ、生産物の調製を効率よく行うことができるようにする方法(特開平03-160988号公報)、卵黄リポ蛋白質、ローヤルゼリー、ラクトフェリンといったリンパ球増殖因子を培地に添加する方法(特開平02-257892号公報)等がある。

【0018】しかしながら、いずれの方法においても、細胞増殖に伴う貧栄養化およびそれに伴う細胞のアポトーシスを避けることはできず、有用物質の生産量には限界がある。

#### 【0019】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等の有用物質を動物細胞から生産する際に、長期にわたって動物細胞の生存を可能とし、それによって有用物質の単位培養量当たりの生産効率を向上させることにある。

#### 【0020】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、鋭意研究した結果、本発明者らは、有用物質を生産する動物細胞のアポトーシスを抑制することにより、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等の有用物質を生産する動物細胞の死滅を抑制し、これによって単位培養量当たりの動物細胞による有用物質生産能を顕著に向上させることができることを発見して本発明を完成した。

【0021】すなわち、本発明は、有用物質を生産する動物細胞にアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物質の生産能を向上する方法、ならびに該方法により得られ、該方法の目的のため使用される細胞の1つである、BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞を提供する。本発明の方法あるいは細胞を使用すれば、有用物質生産細胞の生存率を向上させることができるのみならず、単位培養量当たりの有用物質生産量の増加および有用物質生産速度の向上を得ることができる。

#### 【0022】

【発明の実施の形態】本発明の方法を用いて生産能を向上させることのできる有用物質には、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン、酵素、ペプチド性ホルモン、遺伝子治療用ウィルスベクター等の動物細胞によって産生されるものであればその種類を問わない。

【0023】本明細書でアポトーシス抑制遺伝子とは、例えば、細胞増殖因子の除去、ホルモンの除去、細胞障害性リンパ球等による受容体刺激、抗癌剤、放射線照射、毒素、ウィルス感染、亜鉛イオンの不足、熱ショック、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ 等の腫瘍壊死因子、抗Fas抗体、などの様々な因子により誘導されるアポトーシスを抑制し、細胞を延命化させる機能を有している蛋白質をコードする遺伝子を意味する。本発明で使用できるアポトーシス抑制遺伝子には、例えばbcl-2、BAG-1、Bcl-XL、Ad. E1b、CrmAなどが含まれる。その一例であるbcl-2は、生体内において広範な組織、特に免疫系や神経系で顕著に発現し、また長期間生存幹細胞の存在する皮膚や小腸などの上皮細胞においても発現が観測されており(Negrini, M. et al., Ce 11, 49:455-463, 1987; Eguchi, Y. et al., Nuc. Acid Res., 20:4187-4192, 1992; Hockenbery, D.M. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6961-6965, 1991)、生体内の多くの局面で細胞の自殺防止ならびに延命化に関与すると考えられている(Vaux, D.L. et al., Nature, 335:440-442, 1988)。bcl-2遺伝子はヒト非ホジキン型リンパ腫の染色体転座t(14;18)よりクローニングされた(Science vol. 226, pp1097(1984))26kD蛋白質のbcl-2 $\alpha$ 、22kD蛋白質のbcl-2 $\beta$ をコードする遺伝子であることが知られている。

【0024】本発明の有用物質生産能強化法は、以下の方法によりアポトーシス抑制遺伝子を有用物質生産細胞に導入することによって行われるが、この方法に限定されるものではない。すなわち、有用物質を生産する有用物質生産細胞に対して、例えば、薬物耐性遺伝子配列を含む発現ベクタープラスミドに組み込んだbcl-2を導入する。細胞への遺伝子導入法は既に公知の電トロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポソーム法等の物理的導入法に加え、マウス白血病ウィルスベクターなどのウィルスベクターによる生物的導入法などが使用される。導入後、該薬物耐性遺伝子に対応する薬剤によって薬剤選択を行い、bcl-2が導入された細胞のみを選択する。また、クローニング法については、例えば、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法などの、既知の方法を、特に制限無く用いることができる。薬剤選択によって得られた細胞株は、アポトーシス抑制遺伝子が導入されなかった細胞株に比して、特に長期の培養において有用物質生産能が優れている。

【0025】抗体の生産に関していえば、ハイブリドーマは、培養期間が長くなって培地中の栄養分が不足すると同時に生存率が低下することが知られているが、アポトーシス抑制遺伝子例えば、bcl-2を導入することにより、細胞を延命化させることができ、抗体の生産量および生産速度を著しく増大させることができる。

【0026】また、本発明は、遺伝子治療に用いられる組換えウィルスベクター生産にも応用することができる。一般的に、組換えウィルスベクターは、パッケージング細胞といわれる組換えウィルスベクター生産細胞により生産される。パッケージング細胞は、長期の培養を行うと、貧栄養化により、細胞が死ぬことが知られている。しかし、このパッケージング細胞に、アポトーシス抑制遺伝子を導入すると、パッケージング細胞の延命化が図れ、力価を向上させることができる。このような、貧栄養化による細胞死は、上述したような他の有用組換え蛋白質生産細胞においても生ずるが、アポトーシス抑制遺伝子を導入することにより、組換えウィルスベクターを生産するパッケージング細胞と同様に、細胞の延命化を行うことができ、生産量を増大させることができる。

【0027】本発明のBCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞(以下、COS1/bcl2)は、細

胞を延命化させることによって蛋白質の生産量および生産速度を著しく増大させることができる動物細胞として本発明により見出したものであり、上述の(1)～

(7)の有用物質の大量生産に応用できるものである。蛋白質の代替物質として、検出感度のよい鎖蛋白質を使用し、COS1/bcl2の効果が確認できる。

【0028】COS1/bcl2は平成8年8月26日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15808として寄託された。

【0029】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0030】実施例1：プラスミドの構築

本実施例では、以下のプラスミドを用いた。

【0031】ヒトbcl-2遺伝子配列を含むプラスミドBCMGSneo-bcl-2(図1)は、発現ベクターBCMGSneo(Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exp. Med., 172:969-972, 1990)のXho I-Not I部位に該bcl-2遺伝子を挿入することにより構築した。なお、bcl-2遺伝子としてはbcl-2 $\alpha$ を用いた。

【0032】また、比較例として、bcl-2遺伝子を含まないプラスミドとして、BCMGSneo(図2)を以降の試験に用いた。

【0033】実施例2：ヒトbcl-2遺伝子のハイブリドーマ細胞への導入

トリニトロフェニル基をハプテンとして認識する抗体を産生するマウスハイブリドーマ2E3株に対し、実施例1で調製したBCMGSneo-bcl-2または、比較例としてBCMGSneoをエレクトロポレーション法により導入した(バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法 p23-27)。導入後、G418(GIBCO)選択圧をかけ、プラスミドの導入された細胞のみを選択した。

【0034】実施例3：ヒトbcl-2遺伝子導入ハイブリドーマ細胞におけるBcl-2蛋白質産生の検出(ウエスタンブロッティングによる解析)

実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞のBcl-2蛋白質産生の検出を行った。陰性対照として、BCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞に関しても同様の検出を行った。

(1)細胞の溶解液の調製

BCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞、および、BCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞懸濁液を1%トライトンX-100、0.15mM NaCl、10mM Tris(pH7.4)、50 $\mu$ g/mL phenyl methanesulfonyl fluoride、及び、2 $\mu$ g/mL aprotininを含む細胞溶解液を用いて、4℃で30分間

反応させ、細胞を溶解させた。本細胞溶解液をウエスタンブロッティングの試料として用いた。

【0035】(2)ウエスタンブロッティングによる解析

ウエスタンブロッティングによる解析は、公知の方法に従って行った(バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法 p123-127)。1 $\times 10^5$ 個の細胞に相当する細胞溶解液をTris-SDS-mercaptoethanol緩衝液とを混合して5分間煮沸したのち、sodium dodecyl sulfate(SDS)-ポリアクリルアミドゲル(bcl-2を検出する際のポリアクリルアミドゲルの濃度は、13%とするのが最も好ましい)に試料を負荷した。電気泳動終了後、ゲルを取り外し、30分以上Tris-glycine緩衝液に浸した。ゲルにニトロセルロースフィルターを装着し、蛋白質をニトロセルロースフィルターに転写後、ニトロセルロースフィルターを取り出し、Tris buffered saline-0.05% Tween20(TBS-T)に15分浸し、5%のスキムミルクを含むTBS-T中に2時間浸した後、TBS-Tによる洗浄を3回行った。

【0036】このようにして調製したニトロセルロースフィルターを用い、Bcl-2抗体(Boehringer Mannheim)を含むTBS-T溶液にニトロセルロースフィルターを浸して、1時間穏やかに振とうし、TBS-T溶液で3回洗浄後、二次抗体のパeroxidase結合抗マウスIgGポリクローナル抗体(Bio Source International, Inc-Tago Products)を含むTBS-T溶液にニトロセルロースフィルターを浸した。1時間穏やかに振とうし、TBS-T溶液で3回洗浄後EC1検出試薬(アマシャム)にニトロセルロースフィルターを浸した後、フィルムに感光させた。

【0037】結果を図3に示す。BCMGSneo-bcl-2を導入した細胞(図3中では実施例3として示す)では、Bcl-2蛋白質の発現を示すバンドが検出されたが、陰性対照群のBCMGSneoを導入した細胞(図3中では比較例3として示す)からは、Bcl-2蛋白質の発現を示すバンドは検出されなかった。

【0038】実施例4：ヒトbcl-2遺伝子導入によるハイブリドーマ細胞の生存率の向上

実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞および、陰性対照群であるBCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞の生存率を比較した。

【0039】各々の細胞を9%牛胎児血清を含むダルベッコ・モディファイド・イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(以下、DMEM培地)(GIBCO社)中に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に放置した。培養開始か



ら2日毎に細胞を回収し、トリパンブルー染色法により各ハイブリドーマの生存率を算出した。

【0040】結果を図4に示す。陰性対照群（図4中では比較例4として示す）では、培養6日目において約50%の生存率を示したのに対して、bcl-2導入細胞群（図4中では実施例4として示す）では10日目であった。この細胞生存率の延長は細胞に導入されたbcl-2遺伝子の効果によるものと考えられる。

【0041】実施例5：ヒトbcl-2遺伝子導入による抗体生産効率の向上

実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞および、陰性対照群であるBCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞の抗体産生能を比較した。

【0042】各々の細胞を9%牛胎児血清を含むDME培地中に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に放置した。培養開始から2日毎に培養上清を回収し、本上清に含まれる抗体の濃度をELISA法により測定した。ELISAは抗マウスIgGポリクローナル抗体（ZYMED Laboratories）、及びパーオキシダーゼ結合抗マウスIgGポリクローナル抗体（Bio Source International, Inc-Tago Products）を用いたサンドイッチ法で行った。

【0043】結果を図5に示す。陰性対照群（図5中では比較例5として示す）に比べて、bcl-2導入細胞群（図5中では実施例5として示す）においては、培養時間の増加とともに、著しく抗体濃度が上昇し、10日目では4倍以上の差が見られた。

【0044】実施例6：ヒトbcl-2遺伝子導入による抗体生産速度の向上

また、実施例5で抗体生産効率を測定された各ハイブリドーマ細胞の抗体生産速度についても比較検討した。図6に示すように、bcl-2導入細胞群（図6中では実施例6として示す）の抗体生産速度は、どの期間においても陰性対照群（図6中では比較例6として示す）の2倍以上であった。

【0045】実施例7：プラスミドの構築

本実施例では、以下のプラスミドを用いた。全ての操作は、公知の方法（J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）により行なった。

【0046】ヒトbcl-2遺伝子配列を含むプラスミドBCMGSneo-bcl-2（図1）は、発現ベクターBCMGSneo（Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exd., Med., 172:969-972, 1990）のXhoI-No tI部位に該bcl-2遺伝子を挿入することにより構築した。

【0047】また、比較例として、bcl-2遺伝子を含まないプラスミド、BCMGSneo（図2）を以降の試験に用いた。

【0048】マウス免疫グロブリン1gMのL鎖を構成する蛋白質λ鎖をコードする遺伝子配列（以下、マウスλ1）を含むプラスミドp cDNA-λ（図7）は、pCMV-λ1（Toyoshima, H. et al., Cell, 8, 67-74, 1994）よりPCR法にてマウスλ1鎖部分を増幅してcDNAを合成し、プラスミドベクターp cDNA3（In vitro gen社）に挿入することにより構築した。

【0049】実施例8：ヒトbcl-2遺伝子のCOS-1細胞への導入

BCMGSneo-bcl-2、あるいはBCMGSneoを電気穿孔法（J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）によりCOS-1細胞に導入した。

【0050】COS-1細胞を10<sup>7</sup>個用意し、リン酸緩衝液（PBS）450μlに懸濁した。プラスミドDNA10μgを50μlのPBSに溶解し、前記の細胞懸濁液と混合してキュベットに入れた。パルス装置を650V、250μsecに設定し、細胞懸濁液の入ったキュベットに20回パルスをかけた。氷上にて10分間放置した後、400μg/mlのG418（GIBCO社）及び10%の胎仔牛血清（Fetal Bovine Serum）（FBS）（GIBCO社）を含むダルベッコ・モディファイド・イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium）（以下、DMEM培地）（GIBCO社）と混合し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に30日間放置することで遺伝子導入がなされた細胞のみを選択して、BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞（以下、COS1/bcl2）及びBCMGSneo導入COS-1細胞（以下、COS1/v ec）を得た。BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞（以下、COS1/bcl2）は平成8年8月26日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15808として寄託された。

【0051】試験例7：bcl-2導入細胞のアポトーシスに対する抵抗性の評価

細胞を低血清濃度の培地中で培養すると、これが引き金となってアポトーシスが誘導され、細胞死が起こることが知られている。そこでbcl-2を導入した細胞のアポトーシスに対する抵抗性を調べるために以下の検討を行なった。

【0052】（ヒトbcl-2遺伝子を導入したCOS-1細胞の低血清濃度培地中での培養と生細胞数の測定）COS1/bcl2（実施例8）及びCOS1/v

ec (比較例7) を各々  $10^5$  個ずつ 0.2% の FBS を含む DMEM 培地中で一定期間培養した。培養開始後、2日目、及び9日目に培養皿を PBS で洗浄し、トリプシンで処理することにより培養皿から剥がし、細胞懸濁液を調製した。トリパンブルーにより細胞を染色後、顕微鏡により観察して生細胞数を数えた。結果を図8に示す。比較例7に示された bcl-2 遺伝子を導入されていない細胞は、培養開始時の細胞数 ( $10^5$  個) 上りも減少しているのに対して、実施例8に示される bcl-2 遺伝子が導入された細胞は9日目には初期の細胞数の4倍以上にまで増殖した。本結果から、実施例8で樹立された COS1/bcl2 細胞が、強いアポトーシス抵抗性を示すことが明らかである。

#### 【0053】試験例8 bcl-2 遺伝子導入による蛋白生産性の向上

アフリカミドリザル由来の COS-1 細胞は、組み換え蛋白質の発現、生産に広範に用いられている。そこで、アポトーシス抑制遺伝子を導入した際の、蛋白生産性について評価した。

【0054】(pcDNA- $\lambda$  の COS1/bcl2、COS1/vec、及び COS-1 細胞へのトランスフェクション) トランスフェクションの前日に各々の細胞を  $5 \times 10^5$  個、直径 10 cm の培養皿に播種した。10  $\mu$ g の pcDNA- $\mu$  を DEAE-デキストラン法 (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) によりトランスフェクションし、4時間炭酸ガス培養器内に放置した。培養上清を吸引し、10% DM SO 水溶液 5 ml を添加して2分間静置後、PBS (一) で2回洗浄した。10% ウシ血清を含む DMEM 培地を 10 ml 添加し、一定期間培養した。

【0055】(培養上清液の回収、及び培養上清中の  $\lambda$  鎖蛋白質の定量) pcDNA- $\lambda$  を導入した各々の細胞の培養上清液をトランスフェクションを行なった日を起点として、4、5、6、7、及び14日後に 350  $\mu$ l ずつ回収した。培養上清液に含まれる  $\lambda$  鎖蛋白質の量はホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horse Raddish Peroxidase) 標識ヤギ抗マウス  $\lambda$  鎖抗体を用いた ELISA 法により定量し、4日目

の量を1としてその比で表わした。 $\lambda$  鎖蛋白質の蓄積量は 410 nm での吸光度で測定した。図9に示されるように、アポトーシス抑制遺伝子である bcl-2 が導入されていない細胞株 (比較例7及び比較例8) では  $\lambda$  鎖蛋白質の蓄積量が7日目以降増加していないのに対して、bcl-2 が導入された細胞株 (実施例8) では7日目の2倍以上に増加していた。

#### 【0056】

【発明の効果】以上説明したように、本発明による有用物質生産能強化法および細胞により、有用物質生産細胞の生存率が顕著に向上したのみならず、有用物質の生産量ならびに生産速度が、著しく向上した。

【0057】したがって、本発明により提供される方法および細胞を用いて、例えば、種々の抗体を生産するハイブリドーマ、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等のその他の有用物質生産細胞への応用が可能である。

【0058】本発明の抗体生産能強化法あるいは細胞は、本実施例で例示した bcl-2 のみならず、その他のアポトーシス抑制遺伝子 (Mad/Max、BAG-1、Bcl-XL、Ad.E1b、CrmA 等) を使用しても実施あるいは導入が可能であり、その産業上の利用範囲は極めて大きい。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 BCMGSneo-bcl-2 の構造を示す図である。

【図2】 BCMGSneo の構造を示す図である。

【図3】 ウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図4】 培養時間とハイブリドーマ細胞の生存率との関係を示すグラフである。

【図5】 培養時間と培養上清に含まれる抗体濃度との関係を示すグラフである。

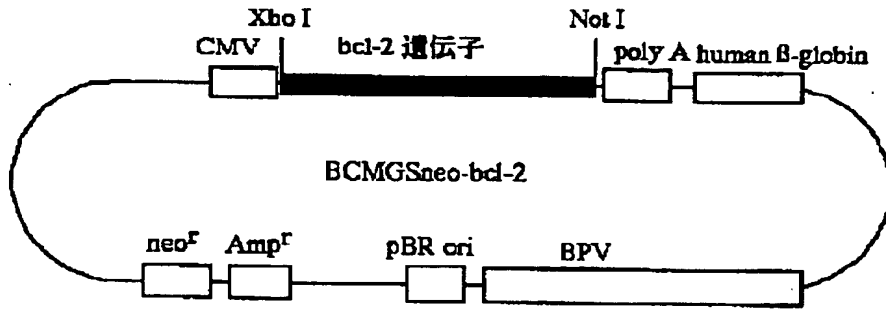
【図6】 培養期間中一定期間毎の抗体生産速度を測定したグラフである。

【図7】 pcDNA- $\lambda$  の構造を示す図である。

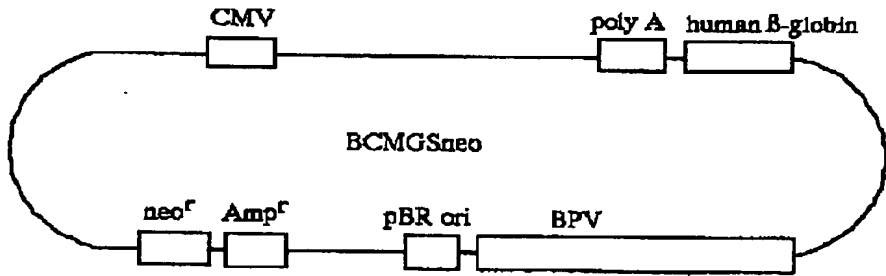
【図8】 培養時間と遺伝子導入された COS-1 細胞の生存数との関係を示すグラフである。

【図9】 培養期間中一定期間毎の蛋白質の生成蓄積量を測定したグラフである。

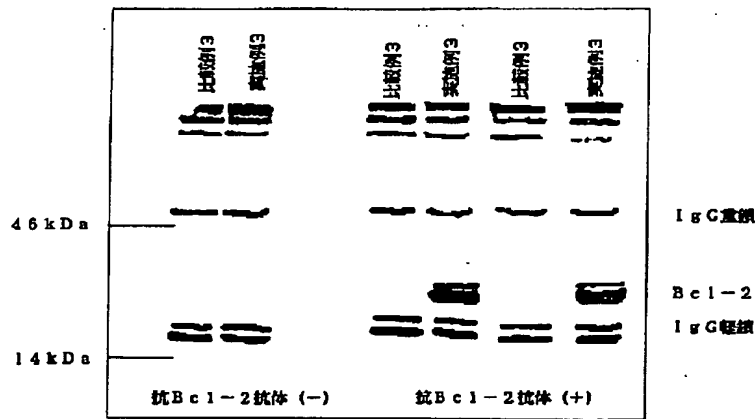
【図1】



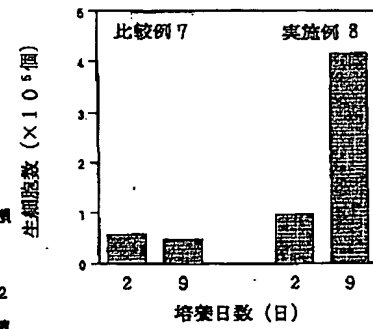
【図2】



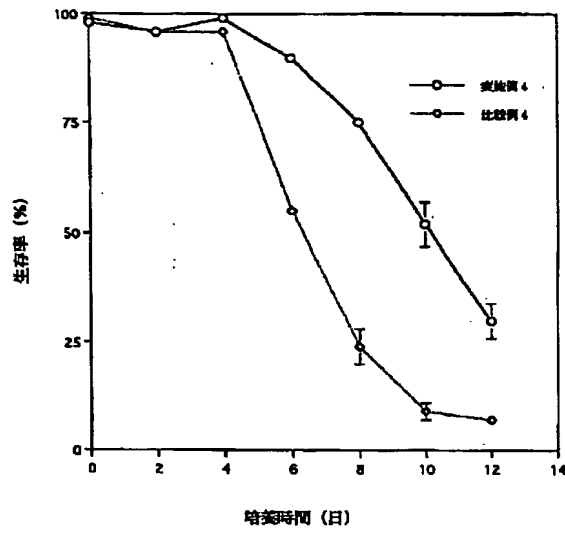
【図3】



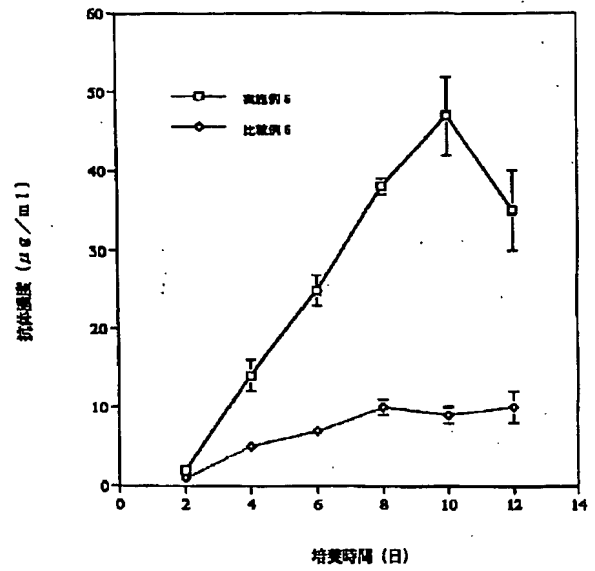
【図8】



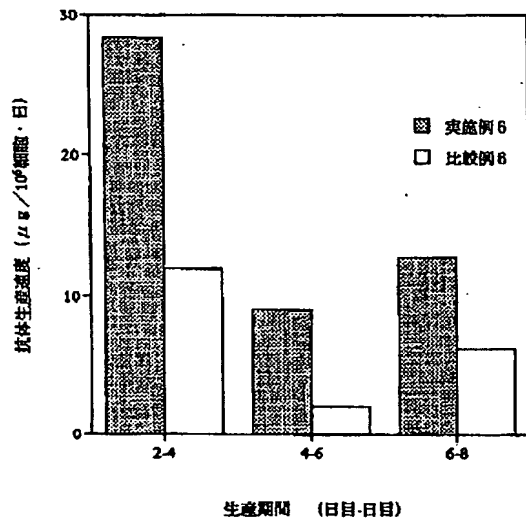
【図4】



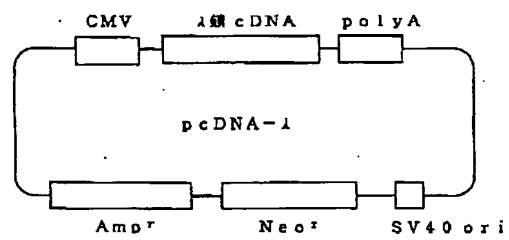
【図5】



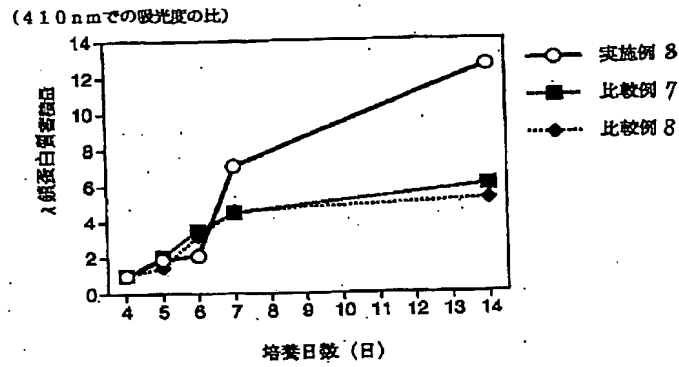
【図6】



【図7】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/00			A 6 1 K 39/395	A
				D
			C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				
(72) 発明者 後藤 武			(72) 発明者 佐藤 秀次	
茨城県つくば市観音台 1-25-11 久光製			茨城県つくば市観音台 1-25-11 久光製	
薬株式会社筑波研究所内			薬株式会社筑波研究所内	